

PCT/JP 2004/008498

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

10.06.2004

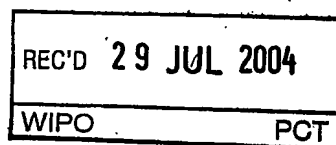
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 6 月 1 0 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 6 4 7 4 7  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 1 6 4 7 4 7 ]

出 願 人  
Applicant(s): 協和醗酵工業株式会社

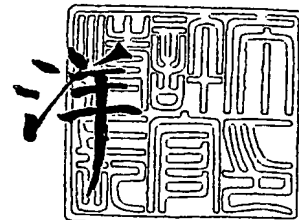


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 1 4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 H15-1226T4

【提出日】 平成15年 6月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A23L 1/056

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会社  
食品開発研究所内

【氏名】 山田 佑樹

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会社  
食品開発研究所内

【氏名】 小笠原 正志

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会社  
食品開発研究所内

【氏名】 広木 薫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡阿見町阿見 4 0 4 1 協和醗酵工業株式会社  
食品開発研究所内

【氏名】 斎藤 知明

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 調味料

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N末端から 1 および 2 番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が 1000 以下のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする飲食品のこく味増強剤。

【請求項 2】 該ペプチドが、3、6 または 9 残基のアミノ酸からなるペプチドである、請求項 1 記載のこく味増強剤。

【請求項 3】 該ペプチドのN末端から 3 番目のアミノ酸がL-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニンである、請求項 1 または 2 記載のこく味増強剤。

【請求項 4】 該ペプチドを構成するアミノ酸のうちの 3 分の 1 以上がグリシンである、請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載のこく味増強剤。

【請求項 5】 該ペプチドが、G l y - P r o - 3 H y p もしくは G l y - P r o - 4 H y p、または G l y - P r o - A l a で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 1 ～ 4 いずれか 1 項に記載のこく味増強剤。

【請求項 6】 請求項 1 ～ 5 いずれか 1 項に記載のこく味増強剤を添加してなる飲食品。

【請求項 7】 N末端から 1 および 2 番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が 1000 以下のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする調味料。

【請求項 8】 該ペプチドが、3、6 または 9 残基のアミノ酸からなるペプチドである、請求項 7 記載の調味料。

【請求項 9】 該ペプチドのN末端から 3 番目のアミノ酸がL-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニンである、請求項 7 または 8 記載の調味料。

【請求項 10】 該ペプチドを構成するアミノ酸のうちの 3 分の 1 以上がグリシンである、請求項 7 ～ 9 いずれか 1 項に記載の調味料。

【請求項 11】 該ペプチドが、G l y - P r o - 3 H y p もしくは G l y - P r o - 4 H y p、または G l y - P r o - A l a で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 7 ～ 10 いずれか 1 項に記載の調味料。

【請求項 12】 請求項 7～11 いずれか 1 項に記載の調味料を添加してなる飲食品。

【請求項 13】 N末端から 1 および 2 番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が 1000 以下のペプチドを飲食品に添加することを特徴とする飲食品のこく味増強方法。

【請求項 14】 該ペプチドが、3、6 個または 9 残基のアミノ酸からなるペプチドである、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】 該ペプチドの N末端から 3 番目のアミノ酸がL-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニンである、請求項 13 または 14 記載の方法。

【請求項 16】 該ペプチドを構成するアミノ酸のうちの 3 分の 1 以上がグリシンである、請求項 13～15 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】 該ペプチドが、G l y - P r o - 3 H y p もしくは G l y - P r o - 4 H y p、または G l y - P r o - A l a で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 13～16 いずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、こく味増強剤、調味料および飲食品のこく味増強方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

基本味とは、味覚の質を表すもっとも基本的な要素で、生理学的には甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の 5 種類の味をいう（非特許文献 1 参照）。

また、基本味以外の味として、こく味がある。こく味とは、持続性のあるうま味をいい、好ましくはこれに濃厚感が付与された味をいう。

うま味調味料や、酵母エキス、蛋白加水分解物、魚介エキス、畜肉エキス等の天然調味料は、うま味等の基本味を付与することはできるが、こく味を十分に付与することは難しい。

【0003】

こく味を付与する方法としては、ピラジン化合物類（特許文献 1 参照）、グル

タチオン（非特許文献2参照）、スルホン基含有化合物、リン酸塩およびペタイン（特許文献2参照）、ゼラチンおよびトロポミオシンの酵素分解物（特許文献3参照）、O/W型の乳化組成物（特許文献4参照）、分子量1000～5000のペプチドとカルボニル化合物とのアミノ-カルボニル反応物（特許文献5参照）等を添加する方法等が知られている。

#### 【0004】

一方、ペプチドは呈味成分として知られ、甘味、苦味、塩味、うま味を有するペプチドがそれぞれ報告されている。例えば、うま味を呈するペプチドとして、魚肉蛋白質を酵素で分解した分子量1000以下の酸性ペプチドで、Glu-Asp、Thr-Glu、Glu-Ser、Glu-Glu、Glu-Asp-Glu、Asp-Glu-Ser、Glu-Gly-Ser、Ser-Glu-Glu、Glu-Gln-Gluで表されるアミノ酸配列からなるペプチド（非特許文献3参照）が知られている。

#### 【0005】

また、ペプチドは基本味の強さを変化させて味覚を変化させる作用があることが知られており、甘味抑制作用、苦味抑制作用、酸味抑制作用およびうま味増強作用を有するペプチドが知られている。例えば、うま味増強作用を有するペプチドとして、鶏肉蛋白質をプロテアーゼ、プロメラインで処理した加水分解物で、Glu-Glu、Glu-Val、Ala-Asp-Glu、Ala-Glu-Asp、Asp-Glu-Glu、Ser-Pro-Gluで表されるアミノ酸配列からなるペプチド（非特許文献4参照）が報告されている。

#### 【0006】

さらに、ペプチドは、こく味を付与する作用を有することが知られている（特許文献6参照）。このようなペプチドとしてグルタチオン（非特許文献2）があげられるが、グルタチオンは加熱により二量体を形成しやすく、こく味付与の機能が低下しやすい等の問題がある。

ペプチドは飲食品の味に様々な影響を与えるため、飲食品のこく味を効果的に増強することのできるペプチドの開発が望まれている。

#### 【0007】

【特許文献 1】

特開平 1 1 - 3 1 3 6 3 5 号公報

【0 0 0 8】

【特許文献 2】

特開平 8 - 2 8 9 7 6 1 号公報

【0 0 0 9】

【特許文献 3】

特開平 8 - 2 2 8 7 1 5 号公報

【0 0 1 0】

【特許文献 4】

特開平 1 0 - 1 7 9 0 2 6 号公報

【0 0 1 1】

【特許文献 5】

特開 2 0 0 2 - 3 3 5 9 0 4 号公報

【0 0 1 2】

【特許文献 6】

特開平 5 - 8 4 0 5 0 号公報

【0 0 1 3】

【非特許文献 1】

丸善食品総合辞典、丸善、1998年、p.280

【0 0 1 4】

【非特許文献 2】

Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1987年, 第61巻, p.1977-1980

【0 0 1 5】

【非特許文献 3】

Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1975年, 第23巻, 第1号, p.49-53

【0 0 1 6】

【非特許文献 4】

Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002年, 第50巻, 第6号, p.1515-

22

## 【0017】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、こく味増強剤、調味料およびこく味増強方法を提供することにある。

## 【0018】

## 【課題を解決するための手段】

本発明は以下(1)～(17)に関する。

(1) N末端から1および2番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が1000以下のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする飲食品のこく味増強剤。

(2) 該ペプチドが、3、6または9残基のアミノ酸からなるペプチドである、上記(1)のこく味増強剤。

(3) 該ペプチドのN末端から3番目のアミノ酸が、L-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニンである、上記(1)または(2)のこく味増強剤。

## 【0019】

(4) 該ペプチドを構成するアミノ酸のうちの3分の1以上がグリシンである、上記(1)～(3)いずれか1つのこく味増強剤。

(5) 該ペプチドが、G l y - P r o - 3 H y p もしくは G l y - P r o - 4 H y p、または G l y - P r o - A l a で表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、上記(1)～(4)いずれか1つのこく味増強剤。

(6) 上記(1)～(5)いずれか1つのこく味増強剤を添加してなる飲食品。

(7) N末端から1および2番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が1000以下のペプチドを有効成分として含有することを特徴とする調味料。

## 【0020】

(8) 該ペプチドが、3、6または9残基のアミノ酸からなるペプチドである、上記(7)の調味料。



(9) 該ペプチドのN末端から3番目のアミノ酸がL-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニンである、上記(7)または(8)の調味料。

(10) 該ペプチドを構成するアミノ酸のうちの3分の1以上がグリシンである、上記(7)～(9)いずれか1つの調味料。

(11) 該ペプチドが、G l y - P r o - 3 H y pもしくはG l y - P r o - 4 H y p、またはG l y - P r o - A l aで表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、上記(7)～(10)いずれか1つの調味料。

(12) 上記(7)～(11)いずれか1つの調味料を添加してなる飲食品。

#### 【0021】

(13) N末端から1および2番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が1000以下のペプチドを飲食品に添加することを特徴とする飲食品のこく味増強方法。

(14) 該ペプチドが、3、6個または9残基のアミノ酸からなるペプチドである、上記(13)の方法。

(15) 該ペプチドのN末端から3番目のアミノ酸がL-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニンである、上記(13)または(14)の方法。

(16) 該ペプチドを構成するアミノ酸のうちの3分の1以上がグリシンである、上記(13)～(15)いずれか1つの方法。

(17) 該ペプチドが、G l y - P r o - 3 H y pもしくはG l y - P r o - 4 H y p、またはG l y - P r o - A l aで表されるアミノ酸配列からなるペプチドである、上記(13)～(16)いずれか1つの方法。

#### 【0022】

##### 【発明の実施の形態】

本発明に用いられるペプチド(以下、本発明のペプチドという)は、N末端から1および2番目のアミノ酸が、それぞれグリシン(G l y)およびL-プロリン(L - P r o)であり、かつ分子量が1000以下のペプチドであればいずれのペプチドも用いられる。

#### 【0023】

ペプチドを構成するアミノ酸の数は、特に限定されないが、3、6または9残

基であることが好ましい。

ペプチドを構成するアミノ酸は特に限定されないが、ペプチドを構成するアミノ酸のうち、3分の1以上がグリシンであることが好ましい。

本発明のペプチドとしては、例えば、N末端から3番目のアミノ酸が、L-ヒドロキシプロリンまたはL-アラニン (L-Ala) であり、かつ分子量が1000以下のペプチドがあげられる。

#### 【0024】

本発明のペプチドにおいて、L-ヒドロキシプロリンは、3-ヒドロキシ-L-プロリン (3Hyp) および4-ヒドロキシ-L-プロリン (4Hyp) のいずれであってもよい。

本発明のペプチドの例としては、例えば、Gly-Pro-Xaa、Gly-Pro-Xaa-Gly-Xaa-Xaa、配列番号1に示される Gly-Pro-Xaa-Gly-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-Xaa 等のアミノ酸配列からなるペプチドがあげられる (ただし、Xaaは任意のアミノ酸を表すものとする)。具体的には、Gly-Pro-3Hyp、Gly-Pro-4Hyp、Gly-Pro-Alaで表されるアミノ酸配列を有するペプチドがあげられるが、これに限定されるものではない。

#### 【0025】

本発明のペプチドは、ペプチド合成機等を用いてペプチド合成しても得ることができるが、コラーゲンまたはゼラチンを、タンパク質加水分解酵素で加水分解して得られる加水分解物を、限外ろ過法、ゲル電気泳動法、ゲルろ過クロマトグラフィー法、超遠心分離法等のペプチドを分子量により分画できる方法、好ましくは限外ろ過法またはゲルろ過クロマトグラフィー法を用いて、分子量1000以下の画分を分取して得ることができる。

#### 【0026】

タンパク質加水分解酵素としては、タンパク質を加水分解することのできる酵素であればいずれの酵素を用いてもよい。例えば、エンドペプチダーゼ、エキソペプチダーゼがあげられるが、エンドペプチダーゼを用いることが好ましい。エンドペプチダーゼとしては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、ズブチリシ

ン等のセリンプロテアーゼ、パパイン、プロメライン、フィシン等のチオールプロテアーゼ、サーモリシン、コラゲナーゼ等のメタルプロテアーゼ等があげられる。

#### 【0027】

これらのタンパク質加水分解酵素は単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

タンパク質加水分解酵素としては、上記のいずれのものであってもよいが、コラーゲンまたはゼラチンを構成するアミノ酸配列中に存在する X a a - G l y (X a a は任意のアミノ酸を表す) の X a a - G l y 間のペプチド結合、好ましくは、X a a - G l y - P r o (X a a は任意のアミノ酸を表す) の X a a - G l y 間のペプチド結合を切断できるものが好ましく用いられる。このようなタンパク質加水分解酵素として、コラゲナーゼがあげられる。

#### 【0028】

コラゲナーゼとしては、Clostridium histolyticum、Streptomyces parvulus、Achromobacter iophagus等の微生物由来のコラゲナーゼ、脊椎動物由来のコラゲナーゼ等があげられるが、微生物由来のコラゲナーゼが好ましく用いられ、Clostridium histolyticum由来のコラゲナーゼがさらに好ましく用いられる。

ゼラチンとしては、コラーゲンを酸処理して得られるゼラチン(タイプA)と、アルカリ処理して得られるゼラチン(タイプB)の二種類があるが、いずれのタイプのものを用いてもよい。

#### 【0029】

コラーゲンまたはゼラチンは、ウシ、ブタ等の動物の骨、皮、腱、軟骨、骨格筋等から常法により調製して得たものを用いてもよいし、市販のものを用いてもよい。

コラーゲンまたはゼラチンを、水性媒体中で、コラゲナーゼ、特にClostridium histolyticum由来のコラゲナーゼで加水分解した場合、G l y - P r o - X a a、G l y - P r o - X a a - G l y - X a a - X a a、配列番号1に示される G l y - P r o - X a a - G l y - X a a - X a a - G l y - X a a - X a a等のアミノ酸配列からなるペプチド(X a a は任意のアミノ酸を表す)を、該水性

媒体中に生成蓄積させることができる。

#### 【0030】

タンパク質加水分解酵素は、市販の精製品を用いてもよいし、該タンパク質加水分解酵素活性を有する微生物、動物、植物等の細胞から通常の酵素精製法に準じて粗酵素または精製酵素を調製して用いてもよい。

また、該タンパク質加水分解酵素活性を有する細胞の培養液、該細胞の培養液を濾過もしくは遠心分離等で固液分離して得られる細胞、または該細胞の処理物をタンパク質加水分解酵素として用いてもよい。該細胞の処理物としては、該タンパク質加水分解酵素活性を有する細胞の培養液を濃縮機もしくは乾燥機等で濃縮もしくは乾燥処理して得られる該細胞の培養液の濃縮物もしくは乾燥物、該細胞を乾燥機等で乾燥処理して得られる該細胞の乾燥物、該細胞を界面活性剤および/または有機溶剤等で処理して得られる該細胞の界面活性剤および/または有機溶剤処理物、該細胞をリゾチーム等の酵素で処理して得られる該細胞の細胞溶解酵素処理物、該細胞の固定化物等があげられる。

#### 【0031】

水性媒体は、タンパク質加水分解酵素が、コラーゲンまたはゼラチンを加水分解できるものであればいずれでもよく、例えば、水、各種緩衝液等があげられ、タンパク質加水分解反応を阻害しなければ、他の成分、例えば、アミノ酸、金属イオン、有機酸等を含んでいてもよい。また、該タンパク質加水分解酵素活性を有する細胞の培養液、該培養液から細胞を除去して得られる上清も、水性媒体として用いることができる。

#### 【0032】

タンパク質加水分解酵素の使用量は、コラーゲンまたはゼラチンの種類等によって異なるため特に限定されないが、コラーゲンまたはゼラチン100重量部に対して0.05～8重量部であることが好ましく、0.1～6重量部であることがより好ましく、0.5～4重量部であることが特に好ましい。

コラーゲンまたはゼラチンのタンパク質加水分解酵素による加水分解処理のpHや反応温度等は、使用する酵素の最適条件またはそれに近い条件を適宜用いればよい。

## 【0033】

pHの調製は、塩酸、酢酸、乳酸、クエン酸またはリン酸のような任意の適当な飲食品に許容しうる酸、または水酸化ナトリウム、水酸化カリウムのような任意の適当な飲食品に許容しうるアルカリにより行うことができる。

コラーゲンまたはゼラチンのタンパク質加水分解酵素による加水分解処理時間は、使用するタンパク質加水分解酵素の使用量、温度、pH等の諸条件により異なるが、1～100時間であることが好ましく、1～72時間であることがより好ましい。

## 【0034】

タンパク質加水分解酵素による加水分解処理終了後、加水分解反応液として得られた加水分解処理液をそのまま次の処理に供することもできるが、加熱処理、酸処理等によって酵素を失活させた後に次の処理に供することもできる。

該加水分解処理液を、限外ろ過法、ゲル電気泳動法、ゲルろ過クロマトグラフィー法、超遠心分離法等の方法等の分子量により分画することのできる公知の方法により分画し、分子量1000以下のペプチドを含有する画分を分取することができる。

## 【0035】

分子量が1000以下のペプチドを含有する画分を、該画分中に含まれる各ペプチドの電荷、極性、分子量、特異性等の差を利用した通常のタンパク質精製法に従って分画、分取することにより、分子量が1000以下のペプチドを含有する画分中に含まれる本発明のペプチドを精製することもできる。電荷の差により精製する方法としては、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、等電点電気泳動法等があげられ、極性の差により精製する方法としては、吸着クロマトグラフィー、濾紙クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー等の方法があげられ、分子量の差により精製する方法としては、限外ろ過法、ゲル電気泳動法、ゲルろ過クロマトグラフィー法、超遠心分離法等の方法があげられ、特異性の差により精製する方法としては、アフィニティークロマトグラフィー法等があげられるが、分子量または極性の差を利用する方法が好ましく用いられ、極性の差を利用する方法がさらに好ましく用いられる。

。極性の差を利用する方法としては上記方法があげられるが、逆相クロマトグラフィーが好ましく用いられる。

#### 【0036】

本発明のペプチドのN末端から1および2番目のアミノ酸がそれぞれグリシンおよびL-プロリンであるか否かは、ペプチド合成機等を用いてN末端から1および2番目のアミノ酸がそれぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が1000以下となるように合成したペプチド、またはこのような配列および分子量を有する市販のペプチドを標準物質として、本発明のペプチドを精製した方法と同じ操作に供し、各ペプチドが該標準物質と同じ画分に分画されるか否かを調べて同定することで決定することができる。

#### 【0037】

また、同定された本発明のペプチドの量は、該精製されたペプチドが存在する画分に相当する画分中の標準物質の量と比較することにより定量することができる。

コラーゲンまたはゼラチンのタンパク質加水分解酵素による加水分解処理液、該加水分解処理液より分取して得られる本発明のペプチドを含有する溶液は、本発明のペプチドを含有する溶液として、そのまま飲食品に添加しても、本発明のこく味増強剤、または本発明の調味料に用いてもよいが、該溶液の処理物として、該溶液を活性炭等による脱色処理、減圧濃縮等による濃縮処理等をして得られる脱色液、濃縮液等の液体、該液体を減圧乾燥、噴霧乾燥等、乾燥処理して得られる固形物、粉末等とし、これを飲食品に添加しても、本発明のこく味増強剤または本発明の調味料に用いてもよい。

#### 【0038】

本発明のペプチドを含有する溶液、該溶液の処理物、該溶液から精製して得られる本発明のペプチド、これらを用いて得られる本発明のこく味増強剤または本発明の調味料を飲食品に添加することにより、飲食品のうま味に持続性を付与させ、飲食品のこく味を増強することができる。

本発明においてこく味とは、持続性のあるうま味をいい、好ましくはこれに濃厚感が付与された味をいう。

## 【0039】

うま味としては、うま味物質が単独、または複数で呈する味があげられる。うま味物質としては、グルタミン酸ナトリウム、アスパラギン酸、オキシグルタミン酸、イボテン酸、トリコロミン酸、イノシン酸ナトリウム、グアニル酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム等をあげることができ、特にグルタミン酸ナトリウムによるうま味をあげることができる。

本発明の飲食品のこく味増強方法としては、本発明のペプチドを使用することを除いて特に限定はなく、通常用いられる飲食品の調味方法を用いることができる。

## 【0040】

本発明の飲食品のこく味増強方法としては、例えば本発明のペプチドを含有する溶液、該溶液の処理物、もしくは該溶液から精製して得られる本発明のペプチドをそのまま、または本発明のこく味増強剤または本発明の調味料として、飲食品を製造する際に該飲食品の原材料の一部として添加する方法、製品となっている飲食品を加熱調理、電子レンジ調理、真空調理等の調理する際または摂食の際に添加する方法等があげられる。

## 【0041】

本発明の飲食品のこく味増強方法の対象となる飲食品はいずれの飲食品であってもよい。例えば、味噌、醤油、たれ、だし、ドレッシング、マヨネーズ、トマトケチャップ等の調味料、吸い物、コンソメスープ、卵スープ、わかめスープ、フカヒレスープ、ポタージュ、味噌汁等のスープ類、麺類（そば、うどん、ラーメン、パスタ等）のつゆ、ソース類、おかゆ、雑炊、お茶漬け等の米調理食品、ハム、ソーセージ、チーズ等の畜産加工品、かまぼこ、干物、塩から、珍味等の水産加工品、漬け物等の野菜加工品、ポテトチップス、せんべい、クッキー等の菓子スナック類、煮物、揚げ物、焼き物、カレー、シチュー等の調理食品等があげられるが、カレー、シチュー、ハンバーグ、豚骨ラーメン等の、肉類を原材料として得られる飲食品が好適にあげられる。

## 【0042】

本発明のこく味増強剤は、本発明のペプチドを含有し、必要に応じて、無機酸

、酸、アミノ酸類、核酸、糖類、調味料、香辛料、賦形剤等の飲食品に使用可能な各種添加物を含有していてもよい。

無機酸としては、食塩、塩化カリウム、塩化アンモニウム等があげられる。酸としては、アスコルビン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、脂肪酸等のカルボン酸およびそれらの塩等があげられる。該塩としては、ナトリウムおよびカリウム塩があげられる。アミノ酸としては、グルタミン酸ナトリウム、グリシン等があげられる。核酸としては、イノシン酸ナトリウム、グアニル酸ナトリウム等があげられる。糖類としては、ショ糖、ブドウ糖、乳糖等があげられる。調味料としては、醤油、味噌、エキス等の天然調味料、香辛料としては各種の香辛料があげられる。賦形剤としては、澱粉加水分解物であるデキストリン、各種澱粉等があげられる。

#### 【0043】

これらの使用量は、使用目的に応じて適宜設定することができるが、例えば、本発明のペプチド100重量部に対して、0.1～500重量部使用できる。

本発明の調味料は、本発明のペプチドおよびうま味物質を含有し、必要に応じて、上記の無機酸、酸、アミノ酸類、核酸、糖類、調味料、香辛料、賦形剤等の飲食品に使用可能な各種添加物を含有していてもよい。

#### 【0044】

本発明の調味料は、こく味調味料として好適に用いられる。

本発明のこく味増強剤または本発明の調味料は、本発明のペプチド、必要に応じてうま味物質を配合する以外は、通常の調味料の製造方法を用いて製造することもできる。

本発明の調味料において、うま味物質、例えばグルタミン酸ナトリウムのうま味またはこく味を増強させるためには、グルタミン酸ナトリウム100重量部に対して、本発明のペプチドを0.01～50重量部となるように配合させることが好ましい。

#### 【0045】

本発明のこく味増強剤または本発明の調味料は、液状、粉状、顆粒状等のいずれの形状を有するものであってもよい。



本発明のこく味増強剤または調味料中の本発明のペプチドの含有量は特に限定されないが、本発明のこく味増強剤または調味料100重量部中、0.01重量部～100重量部、好ましくは0.05～100重量部含有されていることが好ましい。

#### 【0046】

なお、本発明のこく味増強剤または調味料中の本発明のペプチドの含有量は、上記で述べた、分子量1000以下のペプチド溶液中の本発明のペプチドの定量方法と同様の方法を用いて定量することができる。

本発明のペプチドを含有する溶液、該溶液の処理物、該溶液から精製して得られる本発明のペプチド、これらを用いて得られる本発明のこく味増強剤または調味料は、飲食品を製造または調理する際に添加するか、製造または調理された飲食品に添加すればよい。

#### 【0047】

飲食品に使用する本発明のペプチドを含有する溶液、該溶液の処理物、該溶液から精製して得られる本発明のペプチド、これらを用いて得られる本発明のこく味増強剤または本発明の調味料の量は、飲食品1000重量部に対して、本発明のペプチドとして、好ましくは $1 \times 10^{-4}$ ～2重量部、さらに好ましくは $1 \times 10^{-3}$ ～1重量部となるように添加することが好ましい。

以下に本発明の実施例を示す。

#### 【0048】

##### 【実施例】

##### 実施例1

(a) 豚ゼラチン (SIGMA社製) 50 gを蒸留水1000 mlに分散させ、37℃に加熱してゼラチンを溶解させ、37℃で保持した。該ゼラチン溶液にコラゲナーゼ (EC 3.4.24.3、Clostridium histolyticum由来、ナカライテスク社製) を250 mg加えて溶解し、水酸化ナトリウムを用いてpHを7.4に調整し、37℃で2時間反応を行った。反応終了後、反応液を100℃で10分間加熱し、コラゲナーゼを失活させた。反応液を500.0 rpmで、10分間遠心分離し、得られた上清をろ過し、得られたろ液をゼラチンのコラゲナーゼ分解液とし

た。得られたゼラチンのコラゲナーゼ分解液 1000 ml を凍結乾燥して凍結乾燥粉末約 50 g を得た。

#### 【0049】

一方、豚ゼラチン (SIGMA社製) 50 g を蒸留水 1000 ml に分散させ、37℃に加温してゼラチンを溶解させ、37℃で保持した。該ゼラチン溶液にペプシン A (EC 3.4.23.1、和光純薬社製) を 250 mg 加えて溶解し、塩酸を用いて pH を 2.0 に調整した。37℃で 2 時間反応を行った。反応終了後、反応液を 100℃で 10 分間加熱し、ペプシンを失活させた。反応液を 5000 rpm で、10 分間遠心分離し、得られた上清をろ過し、得られたろ液をゼラチンのペプシン分解液とした。得られたゼラチンのペプシン分解液 1000 ml を凍結乾燥して凍結乾燥粉末約 50 g を得た。

#### 【0050】

コラゲナーゼ分解液の凍結乾燥粉末 10 g を 200 ml の水に溶解して得られた溶液 200 ml を、限外ろ過膜 (ミリポア社製) を用いて限外ろ過し、分子量 1000 以下のペプチドを含有する画分 (以下、A 画分と略す) 約 200 ml、および分子量 1000 以上のペプチドを含有する画分 (以下、B 画分と略す) を得た。同様にゼラチンのペプシン分解液凍結乾燥物 10 g を 200 ml の水に溶解して得られた溶液 200 ml を限外ろ過し、分子量 1000 以下のペプチドを含有する画分 (以下、C 画分と略す) 約 200 ml、および分子量 1000 以上のペプチドを含有する画分 (以下、D 画分と略す) を得た。

#### 【0051】

A 画分～D 画分を凍結乾燥し、それぞれ 6.9 g、2.8 g、1.9 g、7.8 g の凍結乾燥粉末を得た。以下の実験には、この凍結乾燥粉末を用いた。

A 画分および B 画分中の全窒素含量を、自動窒素分析計 (サーモフィニガン社製) を用いてデュマ法により測定し、全窒素含量に 6.25 をかけて A 画分中のタンパク質量を算出した。一方、A 画分中の遊離アミノ酸量をアミノ酸アナライザー (日本電子データム社製) を用いて定量した。

#### 【0052】

A 画分中のタンパク質量から遊離アミノ酸量を差し引き、A 画分の凍結乾燥粉

末中の分子量1000以下のペプチドの量を求めたところ、6.9gであった。同様に、C画分の凍結乾燥粉末中の分子量1000以下のペプチド量を求めたところ、1.9gであった。

A～D画分の凍結乾燥粉末をそれぞれ適量の水に溶解し、それぞれ10 $\mu$ lを液体クロマトグラフィー／質量分析に供した。

#### 【0053】

液体クロマトグラフィーのカラムは、Inertsil C8-3 (GLサイエンス社製)を用いた。移動相は、0.02% (w/v) トリフルオロ酢酸水溶液、および0.02% (w/v) トリフルオロ酢酸アセトニトリル溶液を用い、流速0.2 ml/分で100分間の濃度勾配溶出により分離した。検出、定量はLCQ Advantage (サーモエレクトロン社製)を用いて行った。イオン化条件を以下に示す。

#### 【0054】

キャピラリー温度: 250℃

シースガス (Sheath Gas) : 窒素 流量: 40arb

オグジラリーガス (AUX. Gas) : ヘリウム 流量: 10arb

スプレー電圧: 4.5kv

#### 【0055】

定量は、G l y - P r o - 4 H y p のアミノ酸配列からなるペプチド (Bachem社製) およびG l y - P r o - A l a のアミノ酸配列からなるペプチド (Bachem社製) を標準物質として用い、ポジティブ・モードの選択イオンモニタリング (SIM) (分子量244.3および286.3)により実施した。

分析の結果、A画分の凍結粉末中にはG l y - P r o - 4 H y p が5.9% (W/W)、およびG l y - P r o - A l a が1.8% (W/W) 含有されていることがわかった。なお、B～D画分からはG l y - P r o - 4 H y p、およびG l y - P r o - A l a は検出されなかった。

#### 【0056】

(b) ホワイトルウ (ハチ食品社製) 44.6% (W/W)、食塩3.5% (W/W)、グラニュー糖5.1% (W/W)、粉末油脂 (植田製油社製) 11.0% (W/W)、粉末バター (三協食品社製) 7.1% (W/W)、チーズパウダー (六甲バター

社製) 7. 1% (W/W)、脱脂粉乳 8. 1% (よつば乳業社製) (W/W)、ワキシ  
ーコーンスターチ (日澱化学社製) 5. 1% (W/W)、グルタミン酸ナトリウム  
(協和発酵工業社製) 2. 5% (W/W)、5' - リボヌクレオチド (協和発酵工  
業社製) 0. 1% (W/W)、チキンブイヨン (協和発酵工業社製) 3. 5% (W/W  
)、ホワイトペッパー (カネカサンスパイス社製) 0. 1% (W/W)、ローレル  
末 (カネカサンスパイス社製) 0. 2% (W/W)、野菜エキスパウダー (協和発  
酵社製) 2. 0% (W/W) を含有するクリームスープの素 40 g に熱水を加えて  
全量 1L とし、クリームスープを調製した。このクリームスープ 100 ml に、  
上記 (a) で得られたゼラチンのコラゲナーゼ加水分解液の凍結乾燥粉末 200  
mg、またはゼラチンのペプシン分解液の凍結乾燥粉末 200 mg を添加し、得  
られたクリームスープをそれぞれスープ 1 およびスープ 2 とした。スープ 1 およ  
びスープ 2 の風味について、15 人の熟練したパネルにより官能試験を行った。

【0057】

試験は、スープ 1 およびスープ 2 を 50 ~ 60℃ に加熱して口に含み、スープ  
1 とスープ 2 の「うま味の持続性」、「濃厚感」およびこれらの総合として得ら  
れる「こく味」をそれぞれ比較し、強いと感じた方を選択する 2 点評価法で行っ  
た。

結果を第 1 表に示す。数字は、人数を示す。

【0058】

【表 1】

第 1 表

	うま味の持続性	濃厚感	こく味
スープ 1	13	14	13
スープ 2	2	1	2

【0059】

第 1 表から明らかなおとおり、ゼラチンのコラーゲン分解液の凍結乾燥粉末を添  
加したクリームスープ (スープ 1) は、ゼラチンのペプシン分解液の凍結乾燥粉

末を添加したクリームスープ（スープ2）に比べて、明らかに「うま味の持続性」および「濃厚感」が強く、これらの総合として感じられる「こく味」も強かった。

# 【0060】

(c) 上記 (b) において、ゼラチンのコラゲナーゼ加水分解液の凍結乾燥粉末またはゼラチンのペプシン加水分解液の凍結乾燥粉末のかわりに、第2表に示す添加物を、第2表に示す量添加する以外は同様にして、官能試験を行った。

なお、第2表中、Gly-Pro-4Hypで表されるアミノ酸配列からなるペプチドおよびGly-Pro-Ala、Gly-Gly-Glyで表されるアミノ酸からなるペプチドはいずれもBachem社製のものをを用いた。

# 【0061】

【表2】

第2表

試験区	添加物	添加量
1	なし	—
2	A画分(分子量1000以下)	100mg
3	B画分(分子量1000以上)	100mg
4	Gly-Pro-4Hyp	2mg
5	Gly-Pro-Ala	2mg
6	Gly-Gly-Gly	2mg

# 【0062】

評価は、無添加のクリームスープをコントロールとして、クリームスープの「うま味の持続性」、「濃厚感」およびこれらの総合である「こく味」について、熟練した15人のパネルにより行った。コントロールの「うま味の持続性」、「濃厚感」および「こく味」をそれぞれ3点とし、コントロールよりやや弱い場合を2点、2点の場合よりも弱い場合を1点とした。コントロールより強い場合は、やや強い場合を4点、4点の場合より強い場合を5点、5点の場合よりも強い

場合を6点、6点の場合よりも強い場合を7点として評価した。

【0063】

「うま味の持続性」、「濃厚感」および「こく味」について、15人の評点の平均を求めた。

結果を第3表に示す。

【0064】

【表3】

第3表

試験区	うま味の持続性	濃厚感	こく味
1	3.0	3.0	3.0
2	4.4 *	5.7 *	5.7 *
3	5.1 *	4.1	4.3
4	4.7 *	5.6 *	5.3 *
5	5.1 *	5.4 *	5.3 *
6	3.6	3.4	3.3

\* は危険率1%で有意差があることを示す

【0065】

第3表から明らかとなっており、ゼラチンのコラーゲン分解液より得られた分子量1000以下のペプチドを含有する画分（A画分、試験区2）、Gly-Pro-4Hypで表されるアミノ酸配列からなるペプチド（試験区4）、およびGly-Pro-Alaで表されるアミノ酸配列からなるペプチド（試験区5）をクリームスープに添加することにより、無添加のクリームスープに比べて、クリームスープの「うま味の持続性」および「濃厚感」が有意に増強された。特に「濃厚感」は顕著に増強された。また、これらの総合として感じられるクリープスープの「こく味」が有意に増強された。

【0066】

【発明の効果】

本発明により、こく味増強剤、調味料および飲食品のこく味増強方法を提供することができる。

【0067】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1：X a a はいずれかのアミノ酸をあらわす

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Seasoning

<130> H15-122

<160> 1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<221> unsure

<222> (3).. (3)

<223> Xaa stands for any amino acid

<220>

<221> unsure

<222> (5).. (6)

<223> Xaa stands for any amino acid

<220>

<221> unsure

<222> (8).. (9)



<223> Xaa stands for any amino acid

<400> 1

Gly Pro Xaa Gly Xaa Xaa Gly Xaa Xaa

1

5

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明の目的は、こく味増強剤、調味料およびこく味増強方法を提供することにある。

【解決手段】

N末端から1および2番目のアミノ酸が、それぞれグリシンおよびL-プロリンであり、かつ分子量が1000以下のペプチド、例えばGly-Pro-3HypもしくはGly-Pro-4Hyp、またはGly-Pro-Alaで表されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含有することを特徴とする飲食品のこく味増強剤、調味料および該ペプチド、こく味増強剤または調味料を添加することを特徴とする飲食品のこく味増強方法を提供する。

【選択図】 なし

特願2003-164747

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

1990年 8月 6日

新規登録

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

協和醗酵工業株式会社